

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17076014
 研究課題名（和文） 生体ナノ空間としての基底膜による細胞剥離機能に関するナノバイオテクノロジー
 研究課題名（英文） Research of cell detachment behavior from nano-biomaterial surfaces

研究代表者
 大和 雅之（YAMATO MASAYUKI）
 東京女子医科大学・医学部・教授
 研究者番号：40267117

研究成果の概要（和文）：電子線重合法により種々のモノマー濃度で温度応答性高分子のナノ構造体をガラス表面に固定化し、そのナノ構造体の特性を XPS、AFM や新たに開発したラマン分光イメージングを用いて詳細に調べるとともに、構造体の特性が細胞接着および脱着に与える影響についても調べた。その結果、ナノ構造体の厚みが薄ければ薄いほど、再表面の高分子鎖は脱水和され細胞接着性を示すのに対し、厚い構造体の場合は相転移以上の温度でも水和しやすく細胞非接着性を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：Cell sheet engineering using poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified temperature responsive surfaces has been applied to regenerative medicine. Cell attachment/detachment properties strongly depend on the thickness of these polymer layers. However, little is known about the thickness of the temperature responsive polymer layer arising from phase transition under aqueous conditions. In this paper, we characterize different thicknesses of thermoresponsive surfaces using atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and protein adsorption assay. Furthermore, we discuss the thickness dependency of cell attachment/detachment properties of thermoresponsive polymeric surfaces.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	22,200,000	0	22,200,000
2006 年度	22,200,000	0	22,200,000
2007 年度	22,200,000	0	22,200,000
2008 年度	22,200,000	0	22,200,000
2009 年度	22,200,000	0	22,200,000
総計	111,000,000	0	111,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：マルチスケール操作によるシステム細胞工学、A03 班（組織班）

キーワード：基底膜、細胞外マトリックス、組織工学、幹細胞、ニッチェ、温度応答性高分子、電子線

1. 研究開始当初の背景

温度応答性高分子として知られる

poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) を電子線重合法により固定化した温度応答性培

養皿は 32 °C を境に培養皿表面が高温側で疎水性、低温側で親水性に変化する。この性質を利用することで温度変化により培養皿表面上で細胞の接着・脱着を制御することができる。さらに、本表面を利用することでコンフルエント状態まで培養した細胞をシート状で回収することが可能である。近年の報告では、これら細胞の接着・脱着現象はポリスチレン製組織培養皿 (Tissue-Culture-Polystyrene: TCPS) 上に固定化されたポリマー層の厚みが約 15 nm の超薄膜の場合にのみ観察され、その厚みが約 30 nm 程度まで厚くなると細胞の接着性が著しく低下することが明らかになっている。この違いは、疎水性基材である TCPS によるグラフト PIPAAm 鎖に対する脱水和の促進が寄与している。すなわち、膜厚が薄い 15 nm の PIPAAm 固定化表面はより疎水性を示すが、これよりも厚い 30 nm では 15 nm のときのそれよりも水和していると考えられる。このことから、超薄膜の固定化ゲルの物性は基材表面物性の影響を受けることが推察されており、このようなナノ構造体の特性を評価することで新しい材料の設計への応用が期待される。

一方、温度応答性高分子からなるナノ構造体からの細胞外マトリックス (Extra Cellular Matrix: ECM) の剥離が伴う細胞剥離過程の評価は、タンパク質を介したナノ構造体と細胞接着の相互作用、さらには細胞接着性、剥離性の制御について重要な知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では電子線照射重合により、温度応答性ナノ構造体を作製し、その物性を調べ、特性を明らかにすることを目的とした。特にナノ構造体の支配する細胞接着性の要因について、ナノ構造体の厚みの違いから、評価を行った。一方、ナノ構造体の液中、温度変化にともなう変化をリアルタイムかつ非破壊的に観察観察するための新しい顕微鏡装置を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ガラス表面へのアクリロイル基の導入：厚さ約 0.1mm のガラス表面に酸素プラズマを照射し、ガラス表面の有機物の除去を行った。低温プラズマ放電装置にカバーガラス (24 x 50 mm) を設置し、照射強度 400 W, 照射時間 180 s, 酸素圧力 0.1 mmHg の条件でカバーガラスの表面をプラズマ処理し、ガラス表面の不純物を除去するとともにシラノール基を生成させた。次にこのガラス表面でシ

ランカップリング剤を反応させた。シランカップリング剤は、3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン (MPTMS) を使用し、MPTMS 修飾ガラスを作製した (MPTMS-CS)。

(2) 電子線重合によるガラス表面への PIPAAm 修飾：MPTMS-CS 表面へ、2-プロパノールに溶解させた N-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm) を滴下し、電子線重合を行った (PIPAAm-CS)。重合の際、モノマー量を変化させたサンプルを作製した。

(3) PIPAAm-CS の表面物性評価：作成した PIPAAm-CS 表面は FT-IR / ATR、表面接触角測定、XPS、AFM、細胞培養により評価を行った。

(4) ラマン / エリプソメトリー顕微鏡の開発と本顕微鏡を用いた PIPAAm-CS の評価：水和に伴う高分子の形状ならびに膜厚変化を捉えるために、分子形状に敏感なラマン分光と膜厚の精密測定が可能なエリプソメトリーを顕微鏡下で同時に行うことができる光学系を考案し、それに基づいて新しい顕微鏡装置 “ラマン / エリプソメトリー顕微鏡” を自作した。

4. 研究成果

(1) FT-IR/ATR による固定化 PIPAAm の定量および AFM によるナノ構造体の厚み測定：仕込みモノマー濃度と、PIPAAm 固定化量の関係から、仕込みモノマー濃度の上昇にともない PIPAAm 固定化量が増加する傾向が確認された (5wt% IPAAm モノマー仕込み時では 0.84ug/cm²、50wt% IPAAm モノマー仕込み時では 1.49ug/cm²) (表 1)。この結果より、仕込みモノマー濃度を変化させることで、PIPAAm 固定化量を制御できることが示唆された。また、AFM による構造体の厚み測定から構造体はナノオーダーの薄膜状ゲルであることが確認された。

(2) XPS による表面分析：PIPAAm-CS の表面元素組成比は、下地である MPTMS 表面と比較して Si の割合が非常に小さかった。また、C および N 元素の割合が大幅に増加した。さらに PIPAAm-CS の最表面 (Take off angle 10°) の N/C の元素比の値 (0.18) は、PIPAAm の構造から計算される値 (N/C=0.17) と同等な値を示した。Fig. 1 に得られた C 1s スペクトルを示す。点線はガウス関数を用いた波形分離の結果である。ピーク ν_1 , ν_2 , ν_3 はそれぞれ、PIPAAm 中のイソプロピル基を構成する CH₃ 基およびポリマーのバックボーンを構成する CH₂ 基 (284.8 eV)、バックボーンを構成する CH 基 (285.3 eV)、アミド基の N 原子に結合する C 原子 (286.1 eV)、カルボニル基の C 原子 (287.7 eV) に帰属する。各ピークの面積比を、PIPAAm の構造から推測される計算値と比較したところ近い値を示した。これらの結果より、電子線重合法により PIPAAm がガラ

ス表面に固定化されたことが確認された。

Initial monomer concentration [wt%]	Amount of grafted PIPAAm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	PIPAAm Thickness [nm]	Abbreviation
5	0.84 ± 0.03	3.5 ± 0.2	0.84PIPAAm-CS
10	0.86 ± 0.11	4.1 ± 0.2	0.86PIPAAm-CS
20	0.89 ± 0.08	4.4 ± 0.4	0.89PIPAAm-CS
30	1.00 ± 0.09	4.8 ± 0.1	1.00PIPAAm-CS
35	1.28 ± 0.08	7.4 ± 0.3	1.28PIPAAm-CS
40	1.41 ± 0.02	8.8 ± 0.4	1.41PIPAAm-CS
50	1.49 ± 0.07	9.6 ± 0.6	1.49PIPAAm-CS

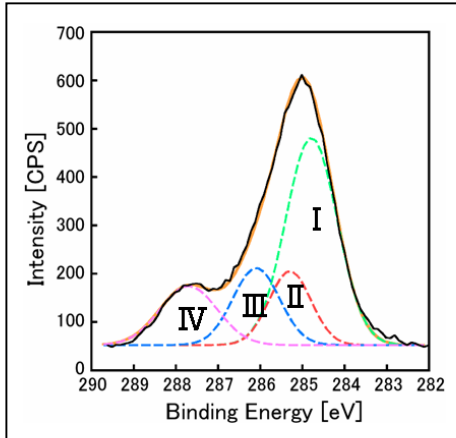
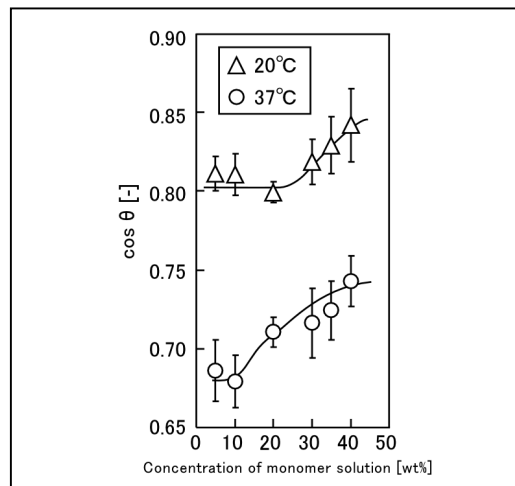


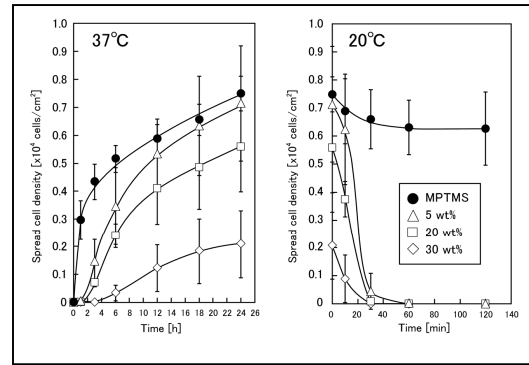
図1 0.84PIPAAm-CS の C1s の Narrow spectrum.

(3) PIPAAm-CS のナノ構造体の表面濡れ性の評価：作製した PIPAAm-CS 表面の 20°C および 37°C での水に対する濡れ性を静的接触角法にて評価した(図2)。高温側では疎水性を示し、低温側では親水性を示す温度応答性の表面であることが確認できた。一方、PIPAAm が固定化されていないシラン処理表面(MPTMS)では、温度による接触角の変化はほぼ観察されなかった。また、PIPAAm 固定化表面ではモノマー濃度の上昇にともない表面がより親水性に変化することが確認された。

(4) PIPAAm-CS 表面における温度変化による細胞接着および脱着挙動の評価：PIPAAm-CS の細胞接着性について評価を行った(Fig2-6, left)。MPTMS 表面に細胞が最もよく接着した。一方、PIPAAm を固定化したガラス表面は、5 wt%の表面が最も接着性が高く、モノマー濃度の上昇にともない細胞の接着



性が低下した (0.84PIPAAm-CS >



0.86PIPAAm-CS > 0.80PIPAAm-CS > 1.00PIPAAm-CS)。また、35 wt%以上の PIPAAm 固定化表面(1.28PIPAAm-CS, 1.41PIPAAm-CS, 1.49PIPAAm-CS)では細胞が接着しなかった。この結果は、モノマー濃度、グラフト量の増加にともなう表面の親水性化の結果と傾向が一致する。

図2 PIPAAm-CS の温度変化にともなう表面濡れ性の変化

図3 PIPAAm-CS の 37°C における細胞接着挙動と 20°C における細胞剥離挙動。

(5) AFM (液中)でのナノ構造体の評価：乾燥時において 3.3 および 8.8 nm の 2 種類のポリマー膜厚の PIPAAm-CS 表面(それぞれは 0.84PIPAAm-CS および 1.41PIPAAm-CS と同等な表面である)に UV エキシマレーザーを照射し、ナノ構造体のみを除去しガラス表面を露出させた。次に AFM を用いて 25°C および 37°C の条件で微細加工部位の水中測定を行った。その結果、ポリマー膜厚 3.3 nm の表面は 6.0 nm(37°C)から 8.0 nm(20°C)と温度変化にともないポリマー層が膨潤したのに対して、膜厚 8.8 nm の表面では、12.9 nm(37°C)から 25.4 nm(20°C)とより大きな厚みの変化が観察された(図4)。また 37°C において微小領域(3 x 3 μm)の表面形状を測定したところ、PIPAAm 表面の脱水和によるマッシュルーム状の凝集が確認され、その大きさは膜厚 3.3 nm の表面で 50 nm 程度だったのに対し、膜厚 8.8 nm の表面では 100 nm 程度だったことから、膜厚の薄い表面でより脱水和が促進されていることが確認された。次に細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンを、上記の 2 種類の表面に 37°C で 24 時間反応させその吸着量を定量したところ、それぞれ膜厚 3.3 nm の表面で 330 ng/cm² (膜厚 3.3 nm)と膜厚 8.8 nm の表面で 130 ng/cm² と大きく異なる値を示した。また、フィブロネクチン吸着後の表面を AFM で測定した結果、その吸着の形態に差が見られた。膜厚 3.3 nm の表面では繊維状の凝集が見られたのに対し、膜厚 8.8 nm の表面では球状あるいは環状の形態が見られた。これらの結果

から、37 °C において膜厚 8.8 nm の表面は膜厚 3.3 nm の表面と比較して水和が促進されており、細胞接着タンパクとの相互作用が弱いことが確認された。

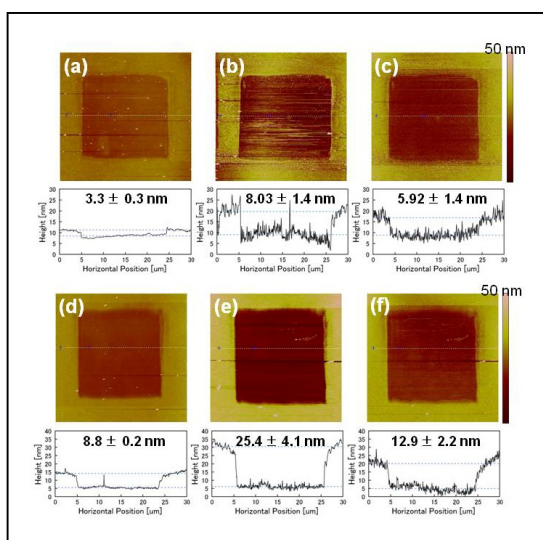


図4 温度変化にともなうナノ構造体の厚みの変化(液中)(上段:0.84PIPAAm-CS、下段:141PIPAAm-CS、大気中:(a), (d)、37液中:(b), (e)、25液中:(c), (f))

これらの結果から超薄膜状のナノ構造体はその厚みによって表面物性が影響を受けることが示された。また、その厚みが薄い場合において分子運動性の抑制、脱水和の促進の効果があることが確認され、より疎水性を示す表面であることがわかった。

(6) 全反射顕微鏡(TIRFMS)による細胞剥離挙動の観察:0.84PIPAAm-CS表面から低温処理により剥離する培養細胞の膜タンパクの挙動をTIRFMにより測定し、タンパク質分解酵素であるトリプシンを用いた場合との違いを検討した。細胞膜貫通タンパクであるインテグリン・1を蛍光染色した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞をPIPAAm固定化ガラス表面に播種し、低温処理および0.1%トリプシンによる2種類の剥離方法をTIRFMにより測定した。その結果、低温処理により方法では、接着細胞が約5分で伸展状態から球状に変化し、部分的にインテグリンを基材表面に残しながら剥離した。また、一般にインテグリンのクラスターは、細胞の伸展、移動において0.1-0.5 μm/min程度の速度で移動することが報告されている。今回、細胞の脱着にともなうクラスターの移動は、約15秒で数μm移動する非常に変化の大きなものだった。一方、トリプシン処理による細胞の剥離過程では基材表面に大部分のインテグリン分子が残存する結果が観察された。これはトリプシン処理による細胞の剥離過程で、インテグリン

分子が切断されたためと考えられる。以上の結果から、作製した温度応答性表面上の細胞膜タンパクの挙動精度よく測定することに成功した。

(6) ラマン/エリプソメリー顕微鏡によるナノ構造体の評価:ラマン/エリプソメリー顕微鏡を用いて温度応答性高分子膜の水和挙動の観察を行った。その結果、温度応答性構文志野振動モードの膜中分布を画像化したラマンイメージと、膜厚の分布を反映したエリプソメリーイメージはコントラストが細部まで一致し、実際に水和挙動を非接触観察可能であることを確認できた。また、膜厚の絶対値の決定にも成功した。観察に要する時間は1フレームあたり約5秒であり、水和過程を追跡するに十分な時間分解能も得られている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計14件)

1. Simultaneous measurements of Raman spectroscopy and ellipsometry under a microscope, A. Hida, and K. Ishibashi, *Rev. Sci. Instrum.*, in press
2. Characterization of ultra-thin temperature-responsive polymer layer and its polymer thickness dependency on cell attachment/detachment properties, Kazuhiro Fukumori, Yoshikatsu Akiyama, Yoshikazu Kumashiro, Jun Kobayashi, Kiyotaka Sakai, Masayuki Yamato, Teruo Okano, in press.
3. Identifications of new near-infrared DIBs in the Orion nebula, T. Misawa, P. Gandhi, A. Hida, T. Tamagawa, and T. Yamaguchi, *Astrophys. J.*, 700: 1988-1993 (2009)
4. Development of the maskless photolithography device with an LCD-projector for fabrication of micropatterned surfaces, K. Itoga, J. Kobayashi, M. Yamato, and T. Okano, *IEEE Proceedings of International Symposium on Micro-Nanomechatronics and Human Science (MHS 2009)*, 368-372 (2009)

5. Features of ultra thin poly(*N*-isopropyl acrylamide) grafted onto glass cover slips, Y. Akiyama, K. Fukumori, M. Yamato, K. Sakai, and T. Okano, *IEEE Proceedings of International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2009)*, 373-378 (2009)
 6. Development of cell-sheet handling tool for measurement of cell sheet adhesion force, K. Uesugi, Y. Akiyama, M. Yamato, T. Okano, T. Hoshino, K. Morishima, *IEEE Proceedings of International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2009)*, 614-619 (2009)
 7. The use of biotin-avidin binding to facilitate biomodification of thermoresponsive culture surfaces, M. Nishi, J. Kobayashi, S. Pechmann, M. Yamato, Y. Akiyama, A. Kikuchi, K. Uchida, M. Textor, H. Yajima and *T. Okano. *Biomaterials*, 28(36): 5471-5476 (2008).
 8. A Novel Approach to Observing Synergy Effects of PHSRN on Integrin-RGD Binding Using Intelligent Surfaces, M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and *T. Okano. *Advanced Materials*, 20: 3034-3038 (2008).
 9. Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly(*N*-isopropylacrylamide) layer, K. Fukumori, Y. Akiyama, M. Yamato, J. Kobayashi, K. Sakai and T. Okano *Acta Biomaterialia*, 5(1): 470-476 (2008).
 10. The effect of extensible PEG tethers on shielding between grafted thermo-responsive polymer chains and integrin-RGD binding, M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano. *Biomaterials*, 29: 3650-3655 (2008).
 11. Development of tunable wavelength Raman microscope and its application to the characterization of carbon nanostructures, A. Hida, T. Suzuki, and K. Ishibashi, *Proceedings of the XXIst International Conference on Raman Spectroscopy*, 250 (2008).
 12. Cells adhesion/detachment control onto temperature-responsive glass coverslips modified with ultra thin poly(*N*-isopropylacrylamide) layer and its application of cell detachment process observed by TIRF microscopy, Y. Akiyama, K. Fukumori, M. Yamato, K. Sakai and T. Okano, *IEEE Proceedings of International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*. (2008).
- [学会発表](計15件)
1. 温度応答性高分子薄膜ゲルの膨潤、収縮の物性評価, 第58回高分子討論会, 熊本, 2009年9月, 福守一浩, 秋山義勝, 熊代善一, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
 2. 原子間力顕微鏡を用いた温度応答性高分子薄膜の物性評価, 第58回高分子学会年次大会, 神戸, 2009年5月, 福守一浩, 熊代善一, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
 3. Observation of cell detachment behavior from temperature responsive polymer grafted surfaces using total internal reflection fluorescence microscopy, *8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers*, Mishima, 2009, May, Kazuhiro Fukumori, Yoshikatsu Akiyama, Yoshikazu Kumashiro, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.
 4. バイオイメージングを指向した温度応答性ガラス表面の作製, 日本医工学治療学会 第25回学術大会, 大阪, 2009年4月, 福守一浩, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
 5. 温度応答性超薄膜ゲル表面の膜厚依存による細胞接着性の変化, 第3回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム, 東京, 2009年3月, 福守一浩, 熊代善一, 秋山義

- 勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
- 阿形清和, 山中伸弥, 岡野栄之, 大和雅之, 岩波書店、2009
- 〔その他〕
ホームページ等
URL: <http://www.twmu.ac.jp/ABMES>
6. Correlation between cell detachment kinetics and temperature-responsive polymer relaxation upon temperature reduction monitored by atomic force microscopy, *14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems*, Salt Lake City, UT, USA, 2009, February, Yoshikazu Kumashiro, Kazuhiro Fukumori, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.
6. 研究組織
(1)研究代表者
大和 雅之 (YAMATO MASAYUKI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40267117
7. Cells adhesion/detachment control onto temperature-responsive glass coverslips modified with ultra thin poly(*N*-isopropylacrylamide) layer and its application of cell detachment process observed by TIRF microscopy, *14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems*, Salt Lake City, UT, USA, 2009, February, Yoshikatsu Akiyama, Kazuhiro Fukumori, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano.
- (2)研究分担者
秋山 義勝 (AKIYAMA YOSHIKATSU)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20349640
8. 温度応答性高分子膜上における細胞接着性の評価, 第 57 回高分子討論会, 大阪, 2008 年 9 月, 熊代善一, 福守一浩, 秋山義勝, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
- 小林 純 (KOBAYASHI JUN)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20385404
9. 温度応答性表面の細胞接着特性と表面近傍に特化した細胞剥離挙動への応用, 第 57 回高分子討論会, 大阪, 2008 年 9 月, 福守一浩, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
- 飛田 聡 (HIDA AKIRA)
理化学研究所・石橋極微デバイス工学研究室・研究員
研究者番号: 30361778
10. 温度応答性ガラス表面の作製とバイオイメージングへの応用, 第 72 回化学工学会秋季大会, 仙台, 2008 年 9 月, 福守一浩, 秋山義勝, 小林純, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
11. 温度応答性ガラス表面を構築した細胞培養基材の開発, 日本医工学治療学会 第 24 回学術大会, 幕張, 2008 年 4 月, 福守一浩, 秋山義勝, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫.
- 〔図書〕(計 1 件)
再生医療生物学(現代生物科学入門第 7 巻),